



TITLE:

Construction of An Artificial Metabolic Channeling System on DNA Origami(Abstract_要旨)

AUTHOR(S):

NGO, ANH TIEN

CITATION:

NGO, ANH TIEN. Construction of An Artificial Metabolic Channeling System on DNA Origami. 京都大学, 2015, 博士(エネルギー科学)

ISSUE DATE:

2015-03-23

URL:

<https://doi.org/10.14989/doctor.k19089>

RIGHT:

学位規則第9条第2項により要約公開; 許諾条件により要約は2016/03/23に公開; 許諾条件により要旨は2016/03/23に公開

(続紙 1)

京都大学	博士（エネルギー科学）	氏名	NGO ANH TIEN
論文題目	Construction of An Artificial Metabolic Channeling System on DNA Origami (DNA オリガミ上での人工的代謝経路の構築)		
<p>(論文内容の要旨)</p> <p>本論文は、1分子の酵素をナノメートル精度で特定の位置に配置する方法論を開発し、それを利用して代謝連続反応に関与する複数種の酵素を特定の空間に配置、代謝連続反応を効率的に進行させるための要因について論じた結果をまとめたものであり、全7章からなっている。</p> <p>第1章は序論であり、生物のエネルギー利用システムを支える代謝経路を細胞外で構築する技術を獲得することで、新たなバイオエネルギーシステムの開発の可能性があることを論じている。その実現のためには代謝反応にかかわる複数の酵素がどのようにして効率よく連続反応を進行させているかを理解することが重要であるとし、ナノメートルの精度で酵素を配置するための鋳型とその鋳型上の特定の位置に酵素を簡便かつ高収率に配置する方法論の必要性について論じている。鋳型としてのDNAナノ構造体の有用性に言及し、そのDNAナノ構造体に酵素を狙い通りに配置する方法論の開発が必要であると結論づけている。</p> <p>第2章では、DNAナノ構造体を鋳型とし、その特定位置に2本鎖DNAを「番地」として配置、その2本鎖DNAに特異的に結合するロイシンジッパータンパク質GCN4を高収率に配置することに成功した。これにより、酵素を1分子ずつ「番地」に配置する際に、GCN4をアダプターとして利用できることを示した。また、GCN4とは異なるDNA配列に結合する亜鉛フィンガータンパク質アダプターとの併用を評価し、これら2種類のアダプターがDNAナノ構造体上の別々の「番地」に対して、それぞれ狙い通りに配置できることを確認した。</p> <p>第3章では、第2章で論じたアダプターGCN4を用いて、キシリトールからキシロースを合成する2量体酵素キシリトールデヒドロゲナーゼをDNAナノ構造体上の特定位置に、酵素活性を保ったまま配置することに成功した。</p> <p>第4章では亜鉛フィンガータンパク質をもとにして、アダプターが特定のDNA配列を認識するだけでなく、その位置でDNAナノ構造体と安定な共有結合を形成するモジュール型アダプターを開発した。これにより、DNAナノ構造体上の特定位置に安定かつ高収率で目的タンパク質を配置することが可能になった。</p> <p>第5章では、キシロースからキシリトールを合成する酵素キシロースリダクターゼを、第4章で開発したモジュール型アダプターとの融合タンパク質を構築することにより、DNAナノ構造体上の特定位置に、酵素活性を保ったまま配置することに成功した。第3</p>			

章で論じたキシリトールデヒドロゲナーゼとキシロースリダクターゼを DNA ナノ構造体上の特定位置に特定の距離で配置することにより、溶液中ではキシロースからキシルロースへの 2 段階反応が進行しない酵素濃度でも、効率よくキシロースからキシルロースへの 2 段階反応が進行することを見出した。また、2 つの酵素の距離と比率を変化させて配置することで、溶液中よりも 2 段階酵素反応を効率的に進行させるための知見を得た。

第 6 章では、DNA ナノ構造体上にキシリトールデヒドロゲナーゼを配置し、その補酵素であるニコチンアミドアデニンジヌクレオチド(NAD^+)に対して高い認識能を有しているリセプターを配置した組織体を構築した。この組織体では、溶液中では反応が進行しない NAD^+ 濃度でも酵素反応が誌淫行したことから、DNA ナノ構造体上のキシリトールデヒドロゲナーゼ近傍の NAD^+ 濃度が局所的に上昇し、酵素反応が進行したと結論づけた。

第 7 章は論文の総括である。

以上、本論文では、酵素を 1 分子ずつナノメートル精度で配置するための鋳型として DNA ナノ構造体に注目し、DNA ナノ構造体上の「番地」に対して機能性タンパク質を配置するための方法論を開発した。この方法論を用いることで酵素活性を減ずることなく、DNA ナノ構造体上の目的の「番地」に酵素を 1 分子ずつ配置することに成功した。さらにこれらの方法論をもちいて、キシロースからキシルロースへの 2 段階代謝反応について、2 種類の酵素の空間配置とその比率を詳細に検討することで、2 段階反応を効率化するための空間的配置条件を見出した。また、リセプターを酵素周辺に配置することで、その酵素活性を制御する新たな方法論を開発した。これらの方法論と知見は、細胞内及び細胞外で人工代謝経路を実現するうえでの重要な基盤となる。

(続紙 2)

(論文審査の結果の要旨)

本論文は、DNA ナノ構造体を鋳型とし、DNA 結合タンパク質をアダプターとして酵素に融合することで、酵素を1分子ずつナノメートルの精度で特定の場所に配置する方法論を開発し、その方法論を用いて、2段階代謝反応を効率的に進行させるための2種類の酵素の空間配置について論じた結果をまとめたものであり、得られた主な成果は次のとおりである。

1. DNA ナノ構造体の特定位置に2本鎖DNAを番地として導入した鋳型を作製し、その2本鎖DNAに特異的に結合するロイシンジッパータンパク質GCN4を2量体アダプターとして利用することで、GCN4を融合した酵素キシリトールデヒドロゲナーゼを、活性を損なうことなく高収率で設計した番地に配置できることを明らかにした。
2. 特定のDNA配列と高収率で共有結合を形成するモジュール型アダプターを開発し、これを融合した酵素キシロースリダクターゼを、活性を損なうことなくDNAナノ構造体上の特定箇所に定量的に配置できることを明らかにした。
3. これらのアダプターを用いて、DNAナノ構造体上に上述した2種類の酵素を分子数と距離を変化させて配置し、各配置条件下でのキシロースからキシロースへの2段階酵素反応効率を詳細に解析した。それにより2段階酵素反応を高効率に進行させるための酵素配置条件を見出した。
4. DNAナノ構造体上に配置したキシリトールデヒドロゲナーゼの周囲に、補酵素ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドのリセプターを配置することで、酵素反応効率を上昇させることに成功した。リセプターが酵素近傍の補酵素濃度を上昇させて酵素活性を発現させる、新たな酵素活性制御方法論を提唱した。

以上、本論文では、酵素を1分子ずつナノメートル精度で配置する方法論を新しく開発するとともに、2種類の酵素による2段階反応が効率よく進行するための空間的配置と、リセプターを特定空間に配置することによる酵素活性の新たな制御方法論を提唱した。これらの成果は、細胞内及び細胞外での人工代謝経路の実現に関わる学術領域に寄与するところが少なくない。

よって、本論文は博士(エネルギー科学)の学位論文として価値あるものと認める。また、平成27年1月28日実施した論文内容とそれに関連した試問の結果合格と認めた。

なお、本論文は、京都大学学位規程第14条第2項に該当するものと判断し、公表に際しては、当該論文の全文に代えてその内容を要約したものとすることを認める。

論文内容の要旨、審査の結果の要旨及び学位論文の全文は、本学学術情報リポジトリに掲載し、公表とする。ただし、特許申請、雑誌掲載等の関係により、要旨を学位授与後即日公表することに支障がある場合は、以下に公表可能とする日付を記入すること。

要旨公開可能日： 2016年 3月 23日以降